



Contrôle de qualité des plantes médicinales et validation de méthodes analytiques

Mamy Rafamantanana
Doctorante UCL Bruxelles- IMRA

Plantes médicinales: Contexte général

- **80% de la population d'Afrique ont recours à la médecine traditionnelle (MTR)**
- **Non disponibilité des médicaments essentiels et coût élevé**
- **Croissance accrue de l'utilisation des produits d'origine naturelle /médecine complémentaire en Europe, USA, (médecine traditionnelle chinoise, médecine ayurvédique, compléments alimentaires...)**
- **Réservoir de nombreuses molécules actives potentielles parfois difficiles à synthétiser**

Plantes médicinales: formes de présentation

- Plantes entières ou parties de plantes fraîches (feuilles, racines...)
- Plantes entières ou parties de plantes séchées (tisanes et poudres)



Plantes médicinales: formes de présentation

- Extraits secs \pm purifiés (en gélules ou comprimés)
- Extraits liquides (teintures, sirop ou extraits fluides)



Contrôle qualité des plantes médicinales: la qualité

Pourquoi?

Puisqu'il s'agit des produits destinés à la santé publique, les préparations à base de plantes doivent suivre les réglementations décrites par les exigences nationales et/ou internationales.

A Madagascar, des lois portant sur la réglementation des plantes médicinales, leurs préparations et leur vente sont déjà en application (Ministère de la santé, 2003).

Contrôle qualité des plantes médicinales: la qualité

**C'est l'aptitude à l'usage,
c'est la conformité aux spécifications,
c'est l'aptitude à satisfaire les clients**

« La qualité c'est l'ensemble des caractéristiques d'un produit ou d'un service qui lui confèrent l'aptitude à satisfaire des besoins implicites et explicites d'un client. »

Contrôle qualité des plantes médicinales: Objectifs

- **Sécurité du client (preuve d'innocuité, d'efficacité, de qualité)**
- **Obtention d'une AMM (insertion de la MTR dans le système de santé national)**

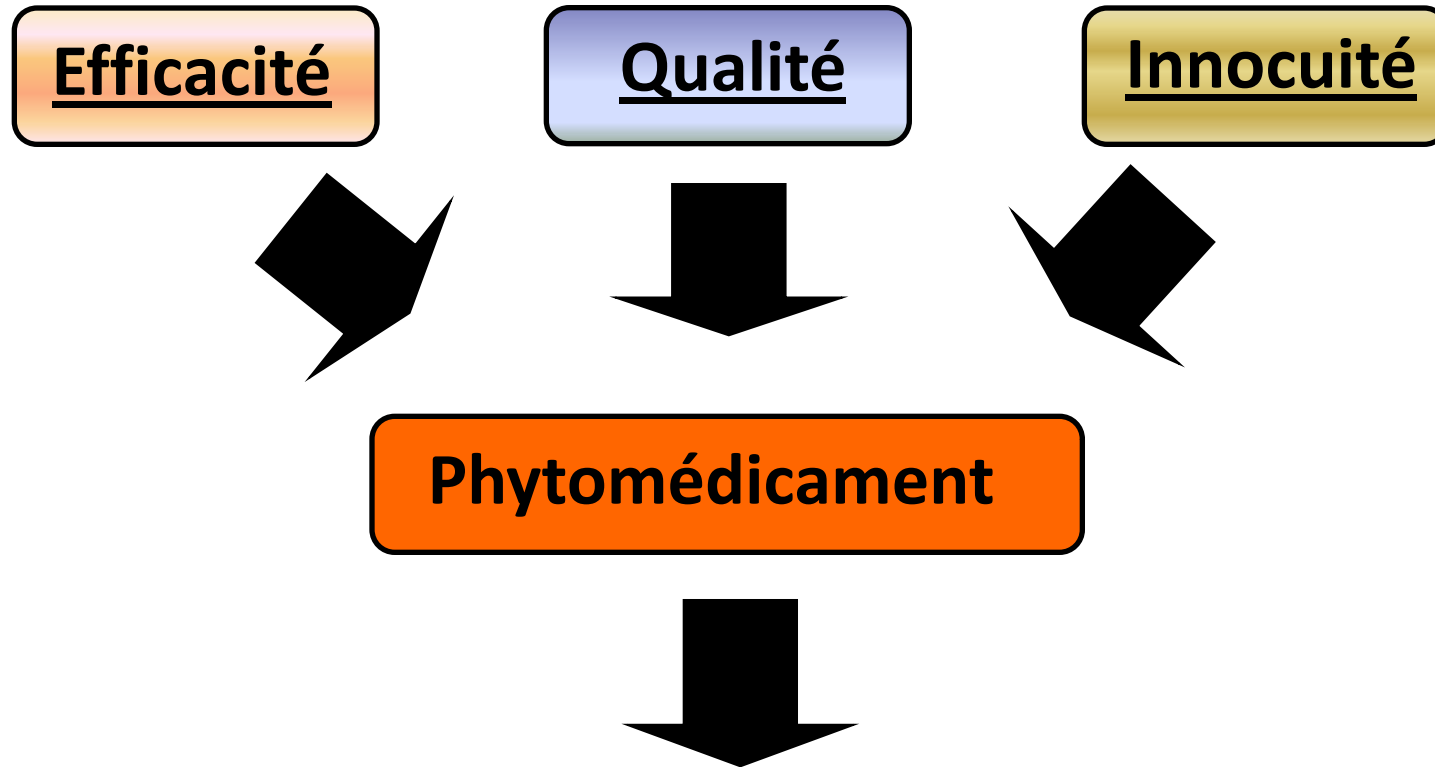


Disponibilité de traitements sûrs et bon marché



Impact positif sur le développement du pays

Contrôle qualité des plantes médicinales: Objectifs



Critères d'enregistrement

Contrôle qualité des plantes médicinales: Objectifs

Efficacité:

- essais pharmacologiques
- essais cliniques
- études après la mise en vente

Qualité:

- identification de la plante
- caractérisation des constituants
- sélection de la méthode analytique la plus adaptée
- standardisation

Innocuité:

- toxicologie
- résidus de pesticides
- présence de métaux lourds
- contamination microbienne

Les monographies et Pharmacopées

- **Pharmacopée européenne → monographies : description des critères de qualité pour**
 - > 110 plantes**
 - > 58 préparations (huiles essentielles, extraits)**
- **Monographies d'autres pharmacopées (USP, BP, Japon,...)**
- **Monographies propres**

Les monographies et Pharmacopées

A Madagascar

- **Pharmacopée de Madagascar (R. Pernet et G. Meyer, 1957)**
- **Pharmacopée de l'Alaotra (1986)**
- **Pharmacopée d'Ambongo et du Boina (1993)**
- **Vers une pharmacopée malagasy: (2009)**



Monographies d'usage

Contenu des monographies (Ph Eur)

Identifications: contrôle d'identité

Essais: contrôle qualité

Dosages: contrôle quantitatif → standardisation

Contenu des monographies (Ph Eur)

Identifications: contrôle d'identité

Essais: contrôle qualité

Dosages: contrôle quantitatif → standardisation

Identifications

- **nomenclature (genre et espèce)**
- **Organoleptique**
- **Macroscopique**
- **Microscopique**
- **Chimique**
 - **Test colorimétrique**
 - **Chromatographie (CCM, GC, HPLC)**



L'identification assure en partie la qualité du produit

Identification: exemples: cas du jean robert



Euphorbia hirta
(EUPHORBIACEAE)
**Diarrhée, albumine,
blénorragies**

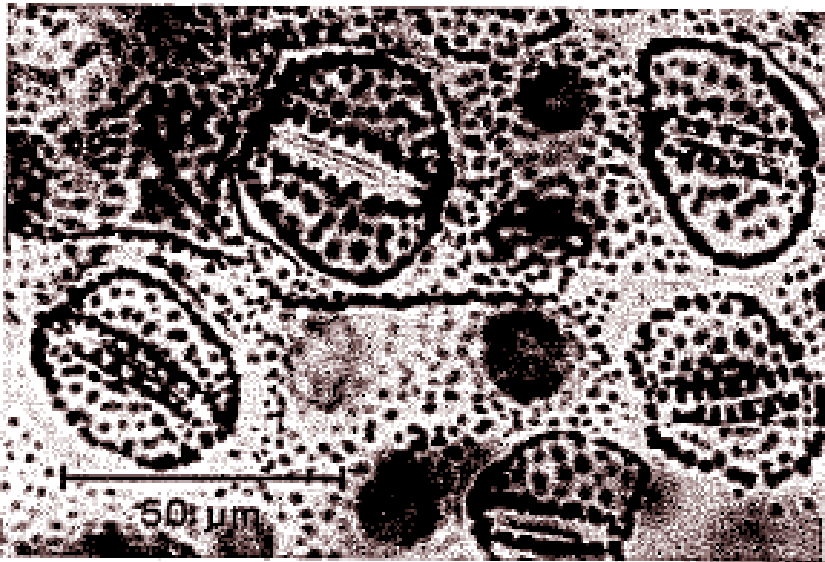


Phyllanthus sp
(EUPHORBIACEAE)
Infections cutanées



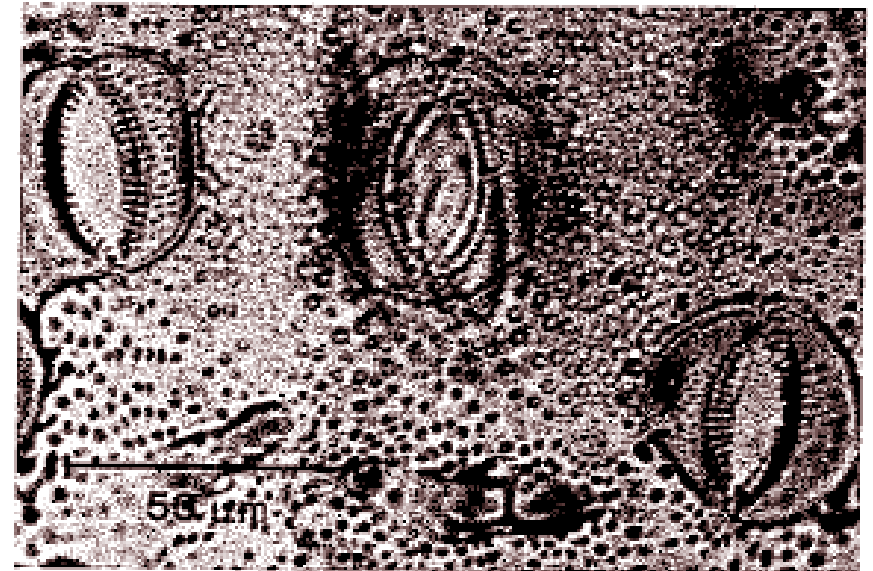
Iresine lindenii
(AMARANTHACEAE)
diarrhée

Identification: exemples




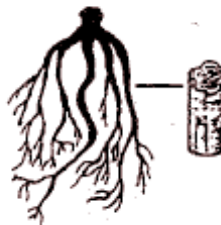
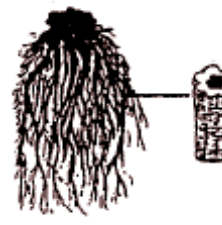


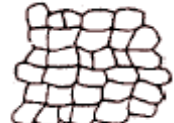
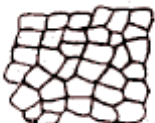





Equisetum arvense
(Diurétique, antirhumatismal)

≠



Equisetum palustre
(toxique)

Famille des Echinaceae (infections des voies respiratoires, guérison des blessures)

	<i>Echinacea pallida</i>	<i>Echinacea angustifolia</i>	<i>Echinacea purpurea</i>	<i>Parthenium integrifolium</i>
Système racinaire				
Couleur	brun clair	brun clair	rouge-brun	noir
Épiderme de la racine Vue du dessus				
Dimensions de la cellule	40 × 80 μm	45 × 30 μm	50 × 30 μm	50 × 20 μm
Cellules à cristaux (CC) et fibres sclérenchymateuses (FS)	le plus souvent isolées ou en amas de 2 à 4 cellules	groupes de 2 à 8 cellules	souvent absentes ou isolées	vastes groupes de 5 à 30 cellules
Longueur CC/FS	50-400/100-300 μm	50-150/300-800 μm	50-120/300-800 μm	50-150/200-350 μm
Poches à huile essentielle	Zone corticale + xylème	Zone corticale	Zone corticale	Zone corticale + partie médullaire
Stockage de phytomélanine	présence	présence	absence	présence
Sclérites dans la poudre de drogue				

Contenu des monographies (Ph Eur)

Identifications: contrôle d'identité

Essais: contrôle qualité

Dosages: contrôle quantitatif → standardisation

Essais

- **Cendres**
- **Éléments étrangers**
 - éléments divers
 - parties étrangères
- **Humidité**

- **Chromatographies → recherche des contaminations**
- **pouvoir rotatoire**
- **densité, teneur en alcool (teinture)**
- **différents indices**

Essais

- **Détermination de l'extrait soluble**
- **Détermination de l'indice de gonflement, indice d'amertume,...**
- **Résidus de pesticides**
- **Contamination microbiologique**
- **Métaux lourds**
- **Aflatoxines**
- **Contaminations radioactives**



**Les essais assurent la qualité et l'innocuité
et du produit**

Essais: exemples: *Panax ginseng* CA Meyer, F: Araliaceae, Nv. Ginseng



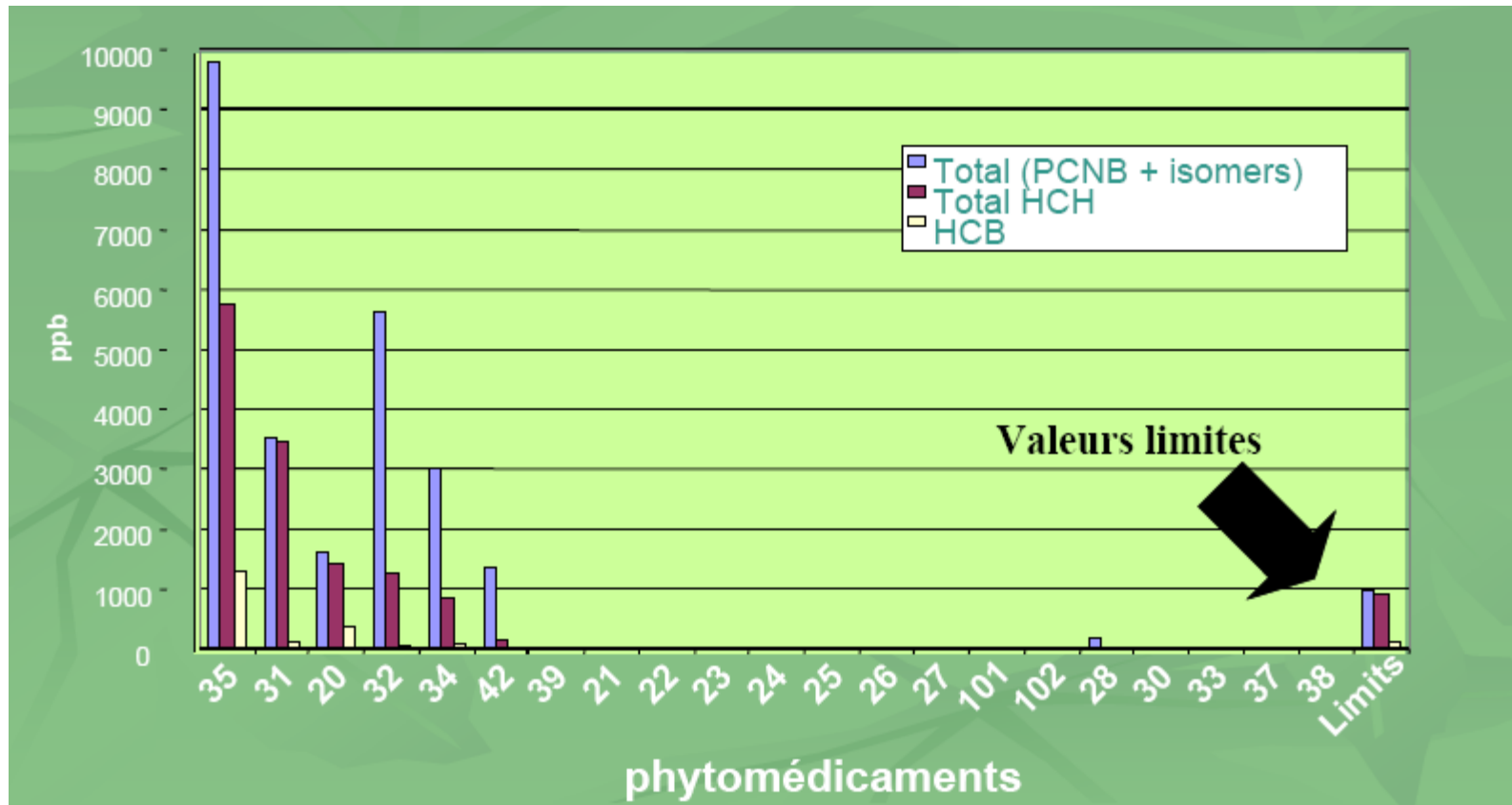
Utilisations

La racine de ginseng est utilisée comme tonique adaptogène. Elle est utilisée dans les asthénies fonctionnelles.

Toxicité

La consommation de phytomédicaments à base de Ginseng n'a pas révélé aucun signe de toxicité. Par contre, la teneur en pesticides dans les produits pourrait être à l'origine de certaines malaises.

Essais: exemples: *Panax ginseng* CA Meyer, F: Araliaceae, Nv. Ginseng

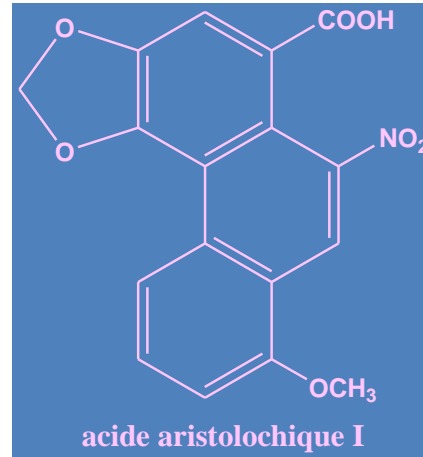


Dosage de pesticides dans des phytomédicaments à base de Ginseng commercialisés sur le marché suisse (Karine Djonko, 1999)

Essais: exemples



Stephania tetrandra S. Moore
F: Menispermaceae
Nv. hanfangji

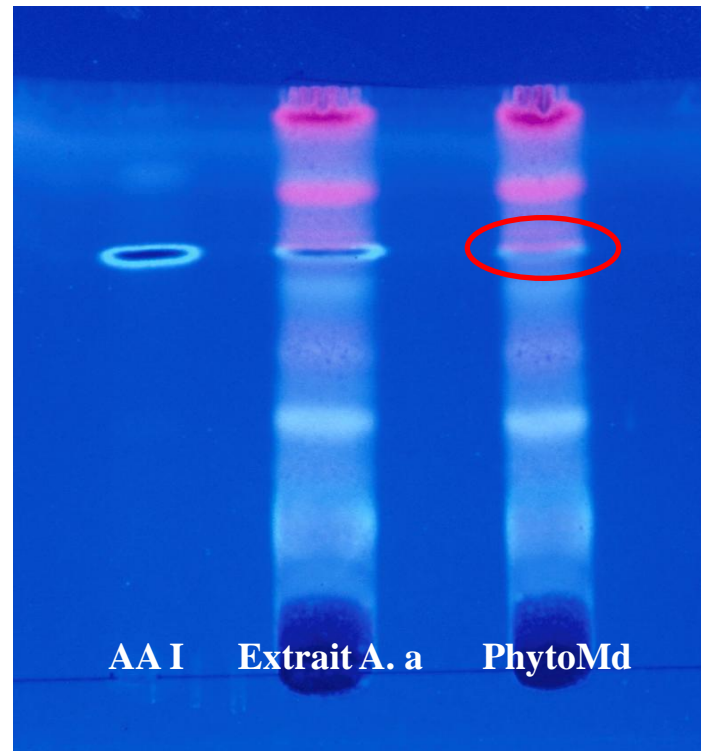


Aristolochia acuminata L.
F: Aristolochiaceae
Nv. guangfangchi

Toxicité

Plusieurs cas d'intoxications inhérents à la consommation de phytomédicaments à visée amaigrissante. Les intoxications se manifestent par des problèmes rénaux évoluant vers une insuffisance rénale terminale avec un cas de décès enregistré. La cause de cette intoxication venait d'une substitution accidentelle de *Stephania* par *Aristolochia*.

Essais: exemples



Chromatogramme de: A: acide aristolochique I, B: extrait MeOH de *A. acuminata*, C: phytomédicament à base de *S. tetrandra* (Guy Raelison, 1999)

Essais: exemples: *Syzygium aromaticum*; F. Myrtaceae; Nv: giroflier

Comparaison de la composition chimique des HE de feuilles, de clous et de griffes

	feuilles	griffes	Clous
Aspect	Liquide limpide, légèrement visqueux	Liquide limpide, légèrement visqueux	Liquide limpide, légèrement visqueux
Couleur	Jaune à brun clair	Jaune à brun clair	Jaune à brun clair
odeur	Epicée caractéristique de eugenol	Epicée caractéristique de eugenol	Epicée caractéristique de eugenol
D²⁰₂₀	1,039 à 1,049	1,041 à 1,059	1,042 à 1,063
IR a 20°C	1,528 0 à 1,538 0	1,528 à 1,535	1,531 à 1,536
α°		-1 ° à +1 °	- 1,5 ° à 0 °

	feuilles	griffes	Clous
Eugénol	80 – 92 %	83 – 92 %	75 – 87 %
β-caryophyllène	4 – 17 %	4 – 12 %	2 – 7 %
Acétate d'eugényle	0.2 – 4 %	0.5 – 4 %	8 – 15 %

Essais: exemples: contamination microbienne d'un phytomédicament

Germes	Nombre	Norme (Ph. Eur.)
Bactéries	>10 ⁵ /g	<10 ⁵ / g
Champignons	>10 ⁴ /g	<10 ⁴ /g
<i>E. coli</i>	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-
Entérobactéries	-	-
Salmonelles	+	-

Source: labo microbiologie IMRA

Contenu des monographies (Ph Eur)

Identifications: contrôle d'identité

Essais: contrôle qualité

Dosages: contrôle quantitatif → standardisation

Dosage

Les méthodes de quantification

- **quantification chromatographique: HPLC, GC, CCMHP**
- **méthode colorimétrique**
- **dosage acido-basique**
- **méthodes pharmacologiques**



Le dosage assure l'efficacité du produit

Classification des phytomédicaments

- Principe(s) actif(s) connu(s) ⇒ **extraits de classe A**
 - quantification de la classe chimique active
 - quantification d'un composé (ou de plusieurs composés) après séparation (souvent chromatographique)
- Tous les principes actifs ne sont pas connus ⇒ **extraits de classe B1**
 - quantification d'un ou plusieurs marqueurs actifs (teneur minimale)
- Les principes actifs ne sont pas connus: ⇒ **extraits de classe B2**
 - quantification de marqueurs

Dosage

Pourquoi?

Homogénéité des lots, reproductibilité des doses et donc des effets

Dosage

Validation de méthodes analytiques

Intérêts

« Le but de la validation est d'établir que la méthode analytique correspond à l'usage pour lequel elle est prévue et de prouver par conséquent la fiabilité des résultats obtenus dans le limites bien définies »

Minimiser les «risques du producteur» et «risques du consommateur »!

Dosage

Validation de méthode analytique

Critères de validation

- **Fonction de réponse (courbe d'étalonnage)**
- **Justesse**
- **Fidélité**
- **Exactitude**
- **Linéarité**
- **Limites de détection (LD) et limite de quantification(LQ)**
- **Intervalle de dosage**

Dosage: exemple



Exemple 1: *Manihot esculenta* Crantz
(Euphorbiaceae)
Nv. Manioc, mangahazo

Utilisations: tubercule, feuilles

- Plante alimentaire (Source d'amidon)
- Apport / jour: 357 kCal, 3.0 g de protides et 0.5 g de lipides (FAO,1999)

Dosage: exemple

Variétés:

- cultivar doux
- cultivar amer

Toxicité:

- Goitres, neuropathie (atrophie des nerfs optiques et auditifs)
- Concentration maximale tolérée:
91.6 mg d'hétéroside cyanogène (HCN) exprimé en linamarine par kg de farine de manioc .

Dosage: exemple

CCMHP: Bodart et al (1998), *J. Planar Chromatogr.*, 11,38-42

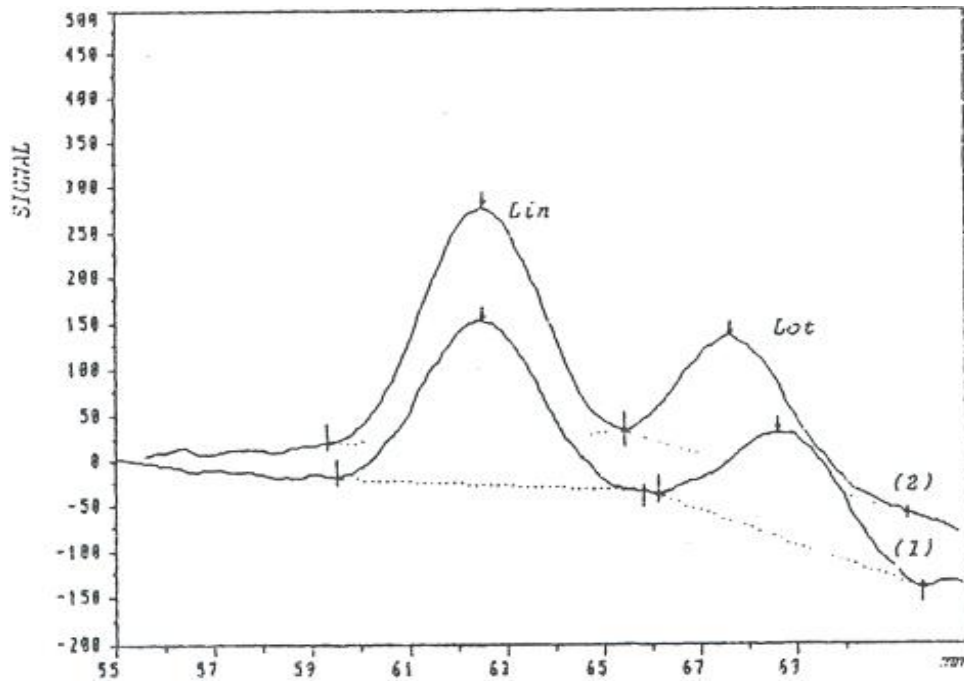
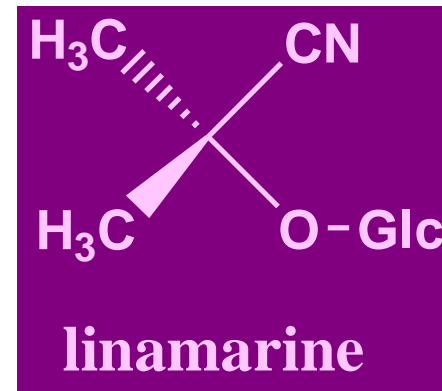


Figure 5

Comparison of the densitograms obtained from (1) *Manihot esculenta* Crantz root and (2) a mixture of linamarin and lotaustralin. Lin, linamarin; Lot, lotaustralin. Scanning using transmission-absorbance mode at $\lambda = 525$ nm.



Dosage: exemple

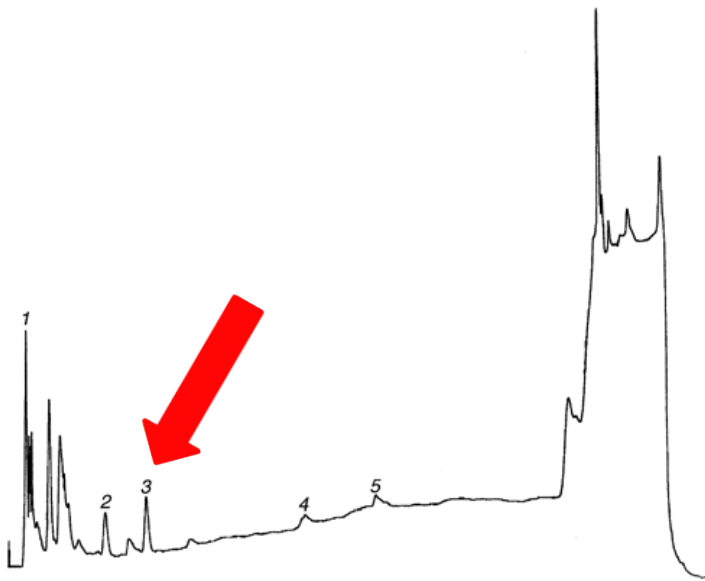


**Exemple 2: *Centella asiatica* (L.) Urb.
(Apiaceae)
Talapetraka**

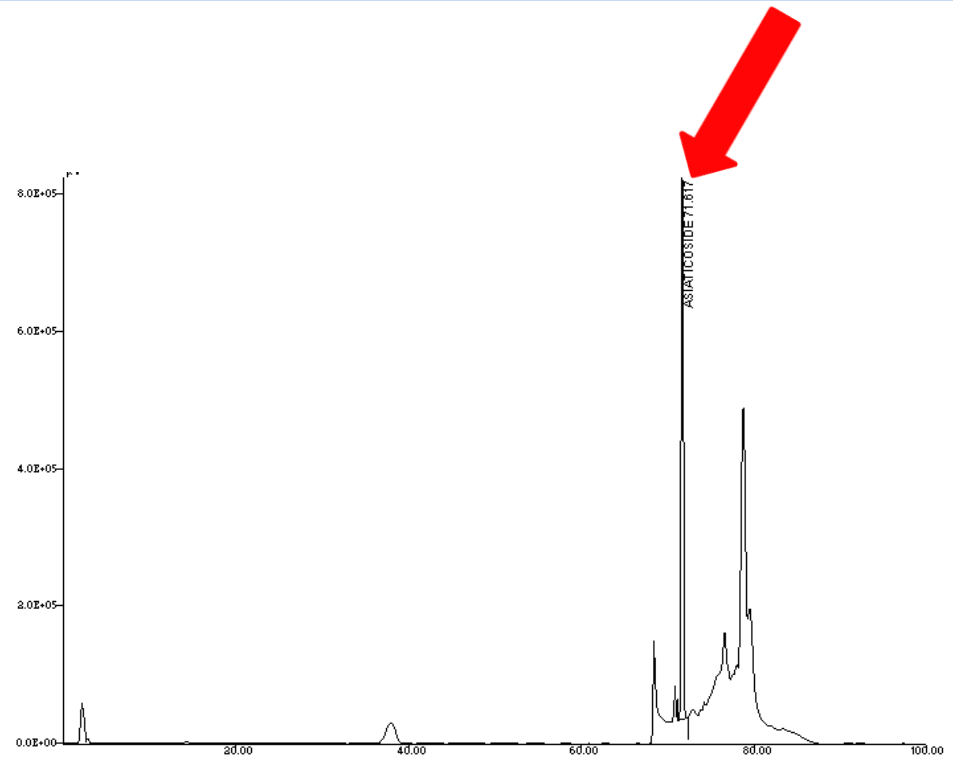
Utilisations traditionnelles

Les feuilles sont utilisées pour traiter les maladies de la peau, l'arthrose, la lèpre, les troubles de la mémoire, les plaies, l'hypertension artérielle, l'ulcère...

Dosage: exemple



Chromatogramme d'extrait de feuilles défini
tR: madecassoside=5.8, asiaticoside=8.1,
acide madecassique=17.6, acide asiatique=21.7



Chromatogramme obtenu
tR asiaticoside=71.6

Dosage: exemple

CLHP: Rafamantanana et al (2009, *J Chrom B*, 877 2396-2402)

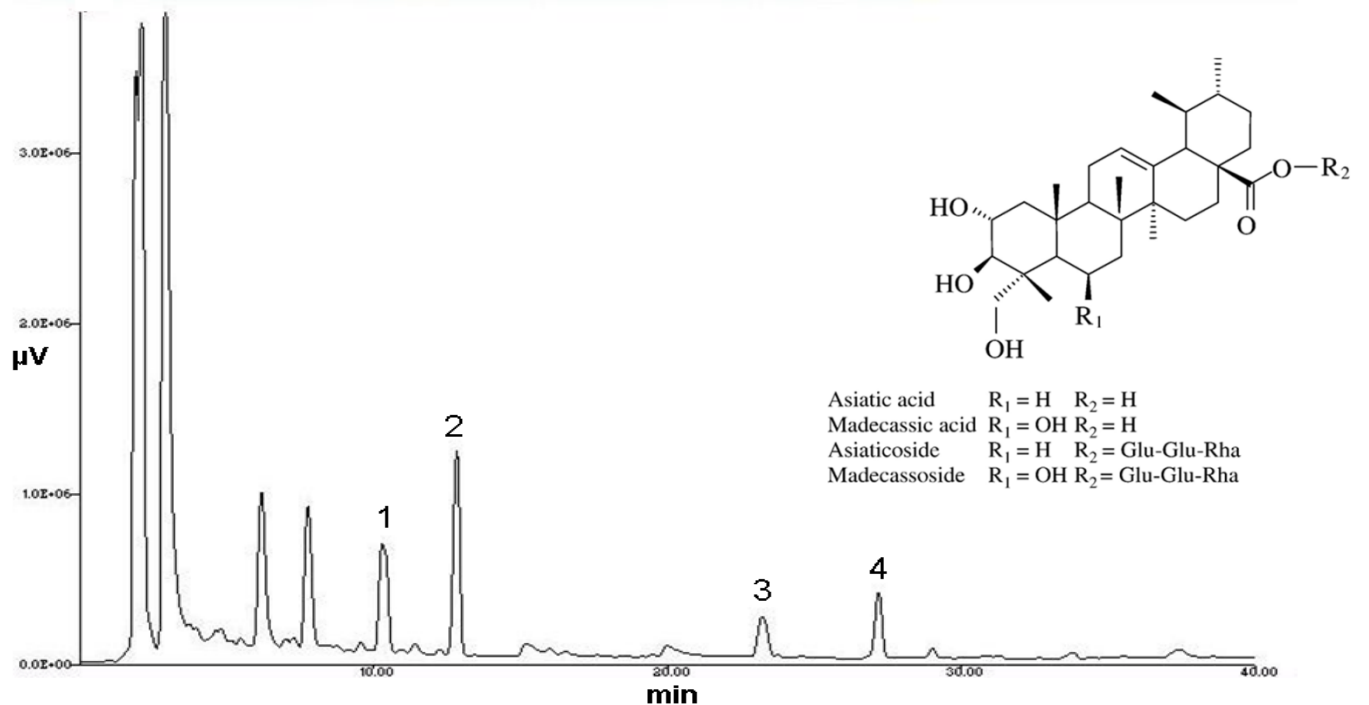


Fig 3: Chromatogram of an extract of *Centella asiatica* obtained with the method developed (1: madecassoside, TR=10.16; 2: asiaticoside, TR=12.68; 3: madecassic acid, TR=23.08; 4: asiatic acid, TR=27.5)
TR: retention time (minute)

Conclusion

- **Importance du travail à accomplir**
 - Un grand nombre de plantes utilisées en médecine traditionnelle n'ont fait l'objet d'aucune étude pharmacologique, toxicologique ou chimique
 - Déforestation intensive → disparition d'espèces non étudiées

- **Besoin d'études pluridisciplinaires**
 - Botanique
 - Agronomie
 - Biologie
 - Chimie
 - Pharmacologie

REMERCIEMENTS

- **Aux organisateurs de ce Symposium**
- **CUD: Coopération Universitaire pour le Développement**
- **Pr Joelle Quetin-Leclercq (UCL- Bruxelles)**
- **Dr Guy Raelison**
- **Pr Phillipe Hubert, Dr Eric Rozet (ULg- Liège)**
- **Pr Suzanne Ratsimamanga (IMRA)**
- **Toute l'équipe de l'Unité de Recherche en Pharmacognosie UCL- Bruxelles**
- **Mes collègues de l'IMRA**
- **A l'assistance**